



P CTRJ 00/00362



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
(РОСПАТЕНТ)

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

рег. No 20/12-74

"9" февраля 2001 г.

REC'D 09 MARS 2001

PCT

RU000/362

10/069971

ESU

### СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности Российского агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение № 99119464, поданной в сентябре месяце 10 дня 1999 года (10.09.1999).

**Название изобретения**

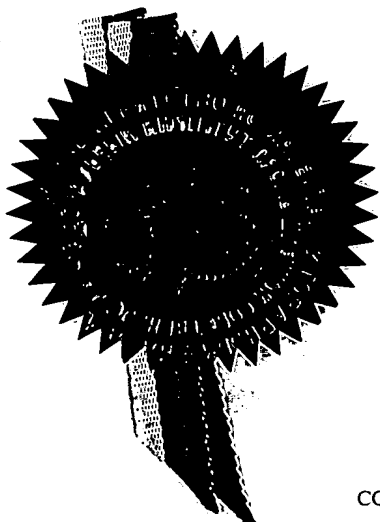
Способ ускорения окисления оксида азота (NO) в гетерогенной среде

**Заявитель**

Институт молекулярной генетики  
Российской Академии наук

**Действительный автор(ы)**

БЕДА Наталья Владимировна  
ГОРДИН Владимир Александрович  
НЕДОСПАСОВ Андрей Артурович  
РАФИКОВ Руслан Робертович  
РАФИКОВА Ольга Валериевна  
СУНЦОВА Татьяна Павловна



**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

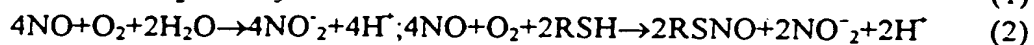
Уполномоченный заверить копию  
заявки на изобретение

И.Ф. Владимирова  
1.О. заведующего отделом

## Способ ускорения окисления оксида азота (NO) в гетерогенной среде.

Изобретение относится к области химии, биохимии и медицины, в частности, к регуляции NO-зависимых процессов в живых организмах.

Оксид азота (NO) — важнейший неорганический метаболит всех высших животных [1-5]. Он участвует в регуляции диаметра кровеносных сосудов [3] и септическом шоке [6], в передаче и хранении информации [4]; является исходным продуктом для синтеза пероксинитрита, который убивает патогенные бактерии и раковые клетки [7, 8]; и выступает в качестве поглотителя свободных радикалов [9, 10]. У млекопитающих NO образуется в результате окисления аргинина кислородом под действием NO-синтаз [4, 11] и распадается при дальнейшем окислении. Известны два основных конкурирующих пути окисления NO: комплексы переходных металлов, например, Hb-O<sub>2</sub>, быстро и необратимо окисляют NO в нитрат (1) – трехэлектронное окисление; в отсутствие переходных металлов свободный O<sub>2</sub> окисляет NO до нитрита или нитрозосоединений (2) – одноэлектронный процесс [1, 5, 12]



Фактически реакция (2) обратима, потому что *in vivo* нитрит и нитрозотиолы могут снова восстанавливаться в NO [5, 13-15]. Таким образом, отношение скоростей процессов (1) и (2) регулирует пул NO и NO-эквивалентов, а через них важнейшие функции организма в норме и патологиях [5, 10, 16].

Известными способами ускорения химических реакций, в т.ч. (2), являются увеличение концентраций реагирующих веществ (реакция (2) суммарно третьего порядка), достигаемое различными методами, и повышение температуры. Для биохимических и медицинских приложений этот путь часто неприемлем, поскольку концентрации NO и кислорода задаются физиологией. Во многих случаях (например, при септическом шоке) целью ускорения реакции (2) является необходимость локального уменьшения концентрации NO с одновременным увеличением концентраций продуктов окисления

(например, нитрозотиолов, выполняющих различные физиологические функции, включая транспорт NO в виде NO-эквивалентов).

Известен также способ ускорения одноэлектронного окисления NO в результате мицеллярного катализа [1, 2], при этом гидрофобная фаза действует как губка, концентрируя реагенты в малом объеме. В [1] способ реализован экспериментально – при добавке к гомогенному водному раствору эмульсий, содержащих гидрофобные компоненты, например, липосом, скорость реакции (2) возрастала, т.е. было показано, что скорость окисления в гетерогенной среде выше, чем в гомогенной. Одновременно в [1] без доказательств принималось, что зависимость ускорения от доли добавляемой гидрофобной фазы монотонна (с увеличением доли гидрофобной фазы скорость реакции непрерывно растет). В [2] было теоретически показано, что эта зависимость имеет максимум при относительно малых долях гидрофобной фазы, при дальнейшем увеличении доли гидрофобной фазы скорость реакции падает. В работе [17] Н.Беда и Т.Сунцовой (авторы настоящей заявки – в соответствии с требованием статьи 4-1 Патентного закона РФ) заявка подается ранее шести месяцев со дня выхода статьи (18.06.99) ошибки в ранее опубликованных работах были проанализированы.

Из уровня техники неизвестно, как ускорить реакцию (2) в изначально гетерогенной системе (практически важен пример - в крови), не изменяя количеств реагирующих веществ, находящихся в системе. Предлагаемое техническое решение состоит в изменении реакционной среды так, чтобы в ней возникла новая фаза с более высоким значением коэффициента распределения  $Q_{NO}$  и/или  $Q_{O_2}$  так, чтобы значение выражения,

$$H = \frac{1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \frac{k_i}{k_n} Q_{NO,i}^2 Q_{O_2,i} X_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i}{\left(1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} Q_{NO,i} X_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i\right)^2 \left(1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} Q_{O_2,i} X_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i\right)} \quad (3)$$

где H- ускорение реакции,  $k_i$ - константа скорости реакции в i-той фазе,  $Q_{NO,i}$ ,  $Q_{O_2,i}$ - равновесный коэффициент распределения NO и  $O_2$  в i-той фазе,  $x_i$ - доля i-той фазы в общем объеме.

описывающее общее ускорение реакции по всей системе (суммарно по всем фазам) возросло. Это может быть достигнуто введением в реакционную среду более гидрофобного компонента (например, перфторуглеводорода) с высоким значением  $Q_{NO}$  и/или  $Q_{O_2}$

Предлагаемое техническое решение имеет изобретательский уровень (т.е. не следует явным образом из уровня техники) – действительно, выдан патент США [18] (1998 г.), где заявлено использование эмульсий перфторуглеводородов для увеличения концентрации NO в организме пациента – авторы предполагают, что NO будет растворяться в гидрофобной фазе, а окислением пренебрегают.

Предлагаемое техническое решение практически осуществимо например, при использовании смеси перфторуглеводородов – «перфторан» (является лекарственной формой разрешенной к клиническому применению). Перфторуглеводороды разрешено использовать как кровезаменители, при этом в кровяное русло вводят существенно больше перфторуглеводорода, чем требуется для достижения максимального ускорения реакции в соответствии с уравнением (3).

Для иллюстрации изобретения приводятся следующие примеры. Эффект мицеллярного катализа был доказан исследованием начальной кинетики окисления оксида азота кислородом в воде, в плазме крови, в растворе эмульсии перфторуглеводородов в воде и в плазме крови после солюбилизации перфторуглеводородов. В качестве эмульсии перфторуглеводородов использовали эмульсию перфтордекалина и эмульсию перфтороктилбромида, стабилизированные поверхностно-активным веществом (Pluronic), а также лекарственную форму – эмульсию “перфторан” (содержание перфтордекалина 13г, содержание перфторметилциклогексилпиперидин 6.5г на 100 мл). Солюбилизацию перфторуглеводородов белками плазмы проводили под действием ультразвука при смешивании плазмы крови с раствором эмульсии перфторуглеводородов. Несолубилизованную часть эмульсии отделяли от раствора плазмы центрифугированием.

Воду, после удаления кислорода, насыщали газообразным оксидом азота. С помощью герметичного стеклянного шприца воду  $V=1\text{мл}$ , насыщенную оксидом азота, добавляли к гетерогенной смеси, находящейся на воздухе. Отбор проб производился через каждые 10 секунд, объем пробы составлял  $50\text{ }\mu\text{л}$ . За кинетикой окисления оксида азота следили по количеству продукта реакции - нитрит иону.



Определение концентрации нитрита производилось немедленно после отбора пробы стандартными реактивами фирмы “R&D Systems” по образованию азокрасителя с максимумом поглощения на длине волны  $540\text{нм}$ . Спектрофотометрические измерения были сделаны на спектрофотометре “Shimadzu 2401PC”. Кинетические данные обрабатывались с помощью программы Origin версии 5.0.

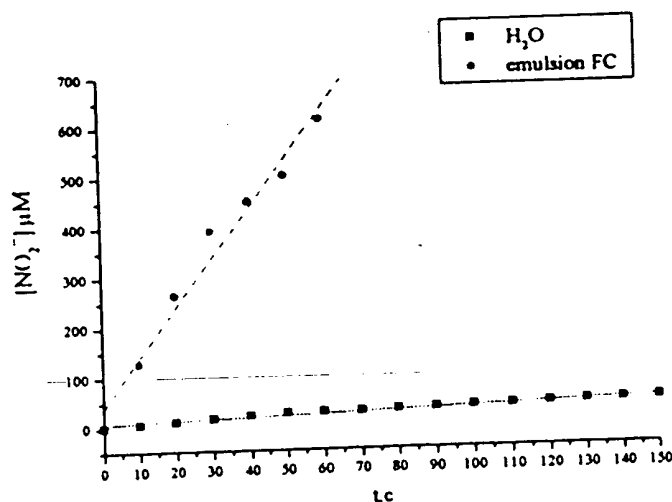
Отношение начальных скоростей реакции окисления NO в присутствии эмульсии перфторуглеводородов и в дистиллированной воде  $W^0_{\text{пфу}}/W^0_{\text{H}_2\text{O}}$ .

Пример	Гетерогенная смесь	$W^0_{\text{пфу}}/W^0_{\text{H}_2\text{O}}$
1	1% эмульсия перфтордекалина	$63 \pm 15$
2	1% эмульсия перфтороктилбромида	$45 \pm 10$
3	20% эмульсия «перфторан»	$40 \pm 10$

Отношение начальных скоростей реакции окисления NO в присутствии эмульсии ПФУ солюбилизированной в плазме крови и в плазме без эмульсии ПФУ  $W^0_{\text{ПФУ}}/W^0_{\text{плазма}}$

Пример	Гетерогенная смесь	$W^0_{\text{ПФУ}}/W^0_{\text{плазма}}$
4	Перфтордекалин солюбилизированный в плазме крови	$25 \pm 5$
5	Перфтороктилбромид солюбилизированный в плазме крови	$14 \pm 5$

Рисунок. Титичная кинетика окисления NO в воде и эмульсии ПФУ.



### Литература.

- [1] Liu, X., Miller, M.J.S., Joshi, M.S., Thomas, D.D. and Lancaster, J.R., Jr. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2175-2179.
- [2] Gordin, V.A. and Nedospasov, A.A. (1998) *FEBS Letters* **424**, 239-242.
- [3] Gow, A.J. and Stamler, J.S. (1998) *Nature* **391**, 169-173.
- [4] Mayer, B. and Hemmens, B.N. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 477-481.
- [5] Nedospasov, A.A. (1998) *Biochemistry (Moscow)* **63**, 881-904.
- [6] Kuhl, S.J. and Rosen, H. (1998) *West. J. Med.* **168**, 176-181.
- [7] Pryor, W.A. and Squadrito, G.L. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, L699-L722.
- [8] Xie, K. and Fidler, I.J. (1998) *Cancer Metastasis Rev* **17**, 55-75.
- [9] Gorbunov, N.V., Tyurina, Y.Y., Salama, G., Day, B.W., Claycamp, H.G., Argyros, G., Elsayed, N.M. and Kagan, V.E. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 647-651.
- [10] Darley-Usmar, V., Wiseman, H. and Halliwell, B. (1995) *FEBS Lett* **369**, 131-135.
- [11] Stuehr, D.J. (1997) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 339-359.

- [12] Liu, X., Miller, M.J.S., Joshi, M.S., Sadowska-Krowicka, H., Clark, D.A. and Lancaster, J.R., Jr. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18709-18713.
- [13] Reutov, V.P., Sorokina, E.G. and Kaiushin, L.P. (1994) *Vopr. Med. Khim.* **40**(6), 31-35.
- [14] Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J. and Kalyanaraman, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18596-18603.
- [15] Kashiba-Iwatsuki, M., Kitoh, K., Kasahara, E., Yu, H., Nisikawa, M., Matsuo, M. and Inoue, M. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 1208-1214.
- [16] Whittle, B.J. (1995) *Histochem. J.* **27**, 727-737.
- [17] Beda, N.V., Suntsova, T.P. (1999) *FEBS Letters* **453**, 229-235.
- [18] Patent USA 5,726,209 (1998) "Liquid Fluorocarbon Emulsion as a Vascular Nitric Oxide Reservoir".

### Формула изобретения:

1. Способ ускорения одноэлектронного окисления оксида азота (NO) кислородом в исходно гетерогенной среде, отличающийся тем что в реакционную смесь вводят компонент(ы), вызывающие образование одной или нескольких новых фаз, так чтобы значение выражения

$$H = \frac{1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \frac{k_i}{k_n} Q_{NO,i}^2 Q_{O_2,i} X_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i}{\left(1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} Q_{NO,i} X_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i\right)^2 \left(1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} Q_{O_2,i} X_i - \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i\right)}$$

где H- ускорение реакции,  $k_i$ - константа скорости реакции в  $i$ -той фазе,  $Q_{NO,i}$ ,  $Q_{O_2,i}$ - равновесный коэффициент распределения NO и  $O_2$  в  $i$ -той фазе,  $x_i$ - доля  $i$ -той фазы в общем объеме.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем что добавляемый компонент(ы) является перфторуглеводородом
3. Способ по п. 1, отличающийся тем что добавляемый компонент является галогензамещенным производным перфторуглеводорода.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем что добавляемый компонент является перфторалкиламином
5. Способ по п. 1, отличающийся тем что добавляемый компонент является раствором белка, солюбилизировавшего фторсодержащее органическое вещество X со значением  $Q_{NO}$  и/или  $Q_{O_2}$  в двухфазной системе вода-X более высоким, чем максимальное из значений  $Q_{NO}$  и/или  $Q_{O_2}$  для произвольной пары фаз реакционной смеси до добавления.
6. Способ по п. 1, отличающийся тем что гетерогенная среда является плазмой крови.



## РЕФЕРАТ

Заявляется метод ускорения реакции окисления оксида азота в гетерогенных средах, в т.ч. плазме крови, добавкой гидрофобных фторсодержащих соединений. Изобретение может найти применение в медицине для коррекции состояний связанных с нарушением метаболизма оксида азота.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100